



TLRを介する自然免疫機構がヒト表皮細胞の色素産生・輸送能に与える影響の検討

著者	小池 咲綾
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第17939号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00123837

学 位 論 文 要 約

博士論文題目 TLRを介する自然免疫機構がヒト表皮細胞の色素産生・輸送能に与える影響の検討

東北大学大学院医学系研究科.....専攻

神経・感覚器病態学 講座.....皮膚科学.....分野

学籍番号 B4MD5053.....氏名 小池 咲綾.....

皮膚は、紫外線照射や創傷、微生物などの外界刺激を絶えず受け続ける人体のバリアとして機能している。表皮の構成細胞の大部分を占める角化細胞（ケラチノサイト）は、外界からの自然免疫刺激を受容する Toll 様受容体（TLR）を発現し、サイトカインや抗微生物ペプチドの発現を誘導することで外界刺激からの人体防衛を担っている。皮膚の基底層に存在するメラノサイトもまた外界からの刺激を受け、色素産生によって人体の防衛を行う。近年、メラノサイトがケラチノサイト同様 TLR を発現し、自然免疫刺激によってサイトカインの放出を誘導することが報告され、メラノサイトもまた自然免疫の影響を受けているであろうことが示唆されているが、これらの刺激がメラノサイトにおける色素産生及びメラノサイトから放出された色素顆粒（メラノソーム）の近隣のケラチノサイトによる取り込みにどのように関与するかは未だよく知られていない。

そこで本研究では自然免疫刺激がメラノサイト内におけるメラニン産生、メラノサイト内における核周辺から細胞膜辺縁へのメラノソーム輸送、及び近隣のケラチノサイトによるメラノソーム取り込みにどのように影響するかを、培養ヒト皮膚表皮細胞を用いて検討した。

まず培養皮膚メラノサイトを TLR1 から 9 の作働物質（アゴニスト）を用いて刺激し、自然免疫刺激が色素形成に及ぼす影響を検討した。その結果、細菌由来の刺激を受容する TLR2 のアゴニストである HKLM、ウイルス由来の刺激を受容する TLR3 のアゴニストである Poly(I:C)の両刺激によって、細胞外放出メラニン量の増加とケラチノサイトへのメラノソーム受け渡しの誘導が確認された。これらの分子機構を確認するため、メラニン産生関連遺伝子に着目したところ、HKLM 刺激メラノサイトではメラニン合成の主要酵素群であるチロシナーゼ遺伝子ファミリーやその転写関連因子である小眼球症関連転写因子（MITF）の遺伝子発現の増加が見られるとともに、チロシナーゼの活性化が確認されたが、その一方で、Poly(I:C)刺激メラノサイトではこれらの誘導が確認出来なかった。そこでメラノソーム輸送に対する Poly(I:C)の影響に着目したところ、Poly(I:C)刺激によって、アクチン線維上におけるメラノソーム輸送を担う分子の一つである Rab27A が遺伝子及びタンパクレベルで有意な発現増加を示すことが判明した。この反応は HKLM 刺激では確認されなかった。更に、Poly(I:C)刺激メラノサイトでは Rab27A やメラノソームマーカーである Gp100 の凝集及び細胞膜辺縁への移行が確認され、これらは siRab27A によって抑制されたことから、Poly(I:C)による細胞外メラニン放出量の増加への Rab27A の関与が示唆された。更に、TLR3 を介し炎症反応を誘導することが報告されてい

る UVB の照射と自然免疫機構の関与を検討した。UVB は Poly(I:C)同様、Rab27A の発現及び Rab27A と Gp100 の細胞膜辺縁における蓄積を誘導し、TLR3 をノックダウンした細胞ではこのような変化は見られなかったことから、UVB がメラノサイト内の Rab27A の発現を増加させ細胞内メラノソーム輸送を誘導する系は、Poly(I:C)同様 TLR3 を介していることが判明した。以上の結果より、TLR3 シグナル伝達経路はメラノサイトにおけるメラノソームの輸送を制御していることが示唆された。

続いて培養皮膚ケラチノサイトにおける TLR2 及び TLR3 を介した自然免疫刺激の影響を検討した。TLR2 アゴニスト HKLM、TLR3 アゴニスト Poly(I:C)、または UVB 照射により刺激を加えたケラチノサイトの培地中に単離メラノソームを添加したところ、Poly(I:C)及び UVB による TLR3 を介した刺激下においてケラチノサイト内へのメラノソーム取り込みの増加が確認された。更に Poly(I:C)刺激が、ケラチノサイトの食作用（ファゴサイトーシス）を誘導することで知られるプロテアーゼ活性化型受容体（PAR-2）及びその下流因子である RAC1、RHOA、CDC42 の遺伝子発現変化を見せ、その変化が siTLR3 処理によって阻害されたことから、Poly(I:C)が TLR3 を介してケラチノサイトのファゴサイトーシスを促進し、メラノソームの取り込みを誘導することが示された。よって、TLR3 を介した刺激はメラノサイトだけではなくケラチノサイトにおいてもメラノソームの取り込みに影響を及ぼしていることが示唆された。

以上の結果により、TLR2 及び TLR3 を介した自然免疫刺激は、それぞれメラノサイト内におけるメラニン合成とメラノサイト内における核周辺から細胞膜辺縁へのメラノソーム輸送の誘導に関与し、その結果、細胞外に放出するメラニン量を増加させることが確認された。更に TLR3 シグナル伝達経路はメラノサイトのみならずケラチノサイトのメラノソーム取り込みにも関与している可能性が示された。このようにメラニン産生や輸送、ケラチノサイトによる取り込みにおいて自然免疫刺激が有意に変化をもたらすことは、細菌、ウイルス感染や紫外線照射に起因する皮膚色形成の過程を理解するための重要な足がかりとなる可能性がある。また表皮細胞（ケラチノサイト及びメラノサイト）は自然免疫機構の細胞小胞体輸送システムへの影響を検討する有用なモデルとなると考えられる。